



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 44 31 598 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁸:
C 12 N 11/04
C 12 N 5/00

②1 Aktenzeichen: P 44 31 598.8
②2 Anmeldetag: 5. 9. 94
④3 Offenlegungstag: 7. 3. 96

⑦1 Anmelder:
Sittinger, Michael, 91056 Erlangen, DE; Bujia, Jesús,
Dr., 80689 München, DE

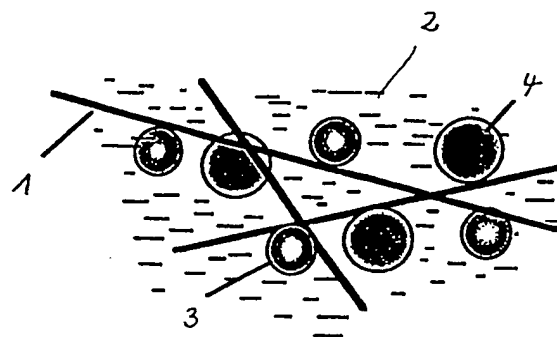
⑦4 Vertreter:
Haft, von Puttkamer, Berngruber, Czybulka, 81669
München

⑧1 Zusatz zu: P 43 06 661.5

⑦2 Erfinder:
gleich Anmelder

⑤4 Verfahren zum Herstellen eines Implantates aus Zellkulturen

⑤7 Bei dem vorgeschlagenen Verfahren zum Herstellen eines Implantates aus Zellkulturen wird die dreidimensionale Trägerstruktur, an die Zellen angelagert sind, zunächst ummantelt und anschließend mit einer Nährlösung perfundiert, über die die Zellen ernährt werden. Mit der Erfindung wird vorgeschlagen, in die Trägerstruktur resorbierbare Mikrokörper, z. B. poröse Mikrokugeln (4) einzubetten, die bei der Resorption die Gewebebildung beeinflussende Faktoren, z. B. entzündungshemmende Antibiotika freigeben. Die Ausbildung der interzellulären Matrix kann auch dadurch verbessert werden, daß die Zellen mit einer Suspension in die Trägerstruktur eingebracht werden, die aus extrazellulären Matrixkomponenten bzw. analogen Materialien besteht.



DE 4431598 A1

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Herstellen eines Implantates aus Zellkulturen, insbesondere Knorpelzellen, wie dieses im Hauptpatent ... (Patentanmeldung P 43 06 661.5) beschrieben ist. Bei diesem Verfahren werden die Zellen auf eine im implantierten Zustand resorbierbare Trägerstruktur aufgebracht, wobei als Trägerstruktur eine dreidimensionale, im wesentlichen formstabile und entsprechend der gewünschten Form des Implantates vorgeformte Trägerstruktur mit einer zusammenhängenden inneren Oberfläche und einem geringen Volumen verwendet wird. In den inneren Hohlraum dieser Trägerstruktur werden die Zellen eingebracht, wonach anschließend die die Zellen aufnehmende Trägerstruktur mit einem Material ummantelt wird, durch die eine Nährlösung in das Innere der Trägerstruktur hindurchströmen, vorzugsweise hindurchdiffundieren, kann. Das gesamte Gebilde der ummantelten Trägerstruktur mit den aufgenommenen Zellen wird anschließend mit einer Nährlösung zumindest solange perfundiert, d. h. durchströmt, bis sich zumindest teilweise eine die Zellen aneinanderbindende interzelluläre Matrix ausgebildet hat. Anschließend wird die Trägerstruktur implantiert, die allmählich im Körper resorbiert wird, wobei sich gleichzeitig die Zellenmatrix weiterbildet.

Das Material für die Ummantelung der Trägerstruktur wird hierbei so gewählt, daß die für den Aufbau der interzellulären Matrix notwendigen Zellenprodukte, insbesondere Kollagene und Proteoglykane im Inneren der Trägerstruktur zurückgehalten werden und aus dem Zellverband nicht ausgeschwemmt werden. Als Material für diese Umhüllung ist z. B. Agarose geeignet. Auch andere Materialien können in Betracht gezogen werden, sofern sie die gewünschten Eigenschaften nach Art einer semipermeablen Membran aufweisen.

Als Trägerstruktur wird vorzugsweise ein dreidimensionales Vlies aus Polymerfasern verwendet, wobei die Fasern selbstverständlich noch vorbereitet werden können, um die Adhäsion von Zellen zu begünstigen.

Ferner ist es vorteilhaft, die Zellen in einer Suspension mit der Nährlösung in die Trägerstruktur einzubringen, wobei zusätzlich die Suspension mit einem Fremdmaterial, wiederum etwa Agarose versetzt wird. Dieses Fremdmaterial erhöht zum einen die Viskosität der Suspension, dient jedoch zum anderen auch dazu, intensiv vermehrte Knorpelzellen, die sich in ihrer Form verändert haben und mehr Fibroblasten ähneln, wiederum zu Knorpelzellen zu redifferenzieren. Für eine solche "Rückbildung" benötigen die Zellen ein umgebendes Medium, z. B. die erwähnte Agarose.

Bei dem beschriebenen Verfahren können zwei Phasen der Implantatentwicklung unterschieden werden. Als erste Phase kann man die Vorformung bzw. Konditionierung des Gewebes *in vitro* betrachten. Die zweite Phase hingegen umfaßt die Reifung und Einheilung des Gewebes *in vivo*, d. h. nach der Implantation. Wie im Hauptpatent erwähnt, besteht während der ersten Phase prinzipiell die Möglichkeit, die Gewebeentwicklung zu steuern, indem vorzugsweise über das Perfusionsystem bestimmte Bedingungen und Faktoren, wie z. B. Zugabe von Serum oder gewebsmorphogener Proteine, vorgegeben werden. Nach der Transplantation *in vivo* besteht jedoch derzeit keine Möglichkeit mehr, die Gewebebildung zu beeinflussen.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, das in dem Hauptpatent angegebene Verfahren zu verbessern und

insbesondere die Gewebebildung durch zusätzliche Maßnahmen zu begünstigen.

Mit der Erfindung wird hierzu vorgeschlagen, in die Trägerstruktur resorbierbare Mikrokörper einzubetten, in denen die Gewebebildung beeinflussende Faktoren aufgenommen sind, die ihrerseits bei der allmählichen Resorption der Mikrokörper freigegeben werden. Als Mikrokörper können z. B. poröse Mikrokugeln mit einem Durchmesser zwischen etwa 10 und 200 Mikrometern, vorzugsweise zwischen 20 und 50 Mikrometern, aus einem resorbierbaren Material, z. B. aus Polylactid verwendet werden, in die die gewünschten Faktoren zur Gewebedifferenzierung oder zur Entzündungshemmung eingebunden sind. Derartige Faktoren können z. B. Peptid-Faktoren, z. B. entzündungshemmende Cyclopeptid-Antibiotika, wie Gycochlorin A, oder geeignete rekombinante gewebsmorphogene Proteine sein, die im Transplantat langsam, d. h. über mehrere Monate hinweg, freigesetzt werden. Wenn die Mikrokörper, z. B. die erwähnten porösen Mikrokugeln, in ihrer Größe den Zellen ähneln, können diese beim Kulturansatz der Zellsuspension beigemischt werden und so in gleicher Weise wie die Zellen im Polymervlies verteilt werden. Die Degradation der Mikrokörper muß bei der Herstellung so eingestellt werden, daß sich die Freisetzung der Faktoren über die gewünschte Zeit, z. B. mehrere Monate, erstreckt.

Wie oben erwähnt, ist es vorteilhaft, neben der resorbierbaren Trägerstruktur, insbesondere aus einem Polymervlies, auch noch ein Fremdmaterial, z. B. Agarose, einzusetzen. Anstelle der Agarose können auch andere Materialien verwendet werden, die eine semipermeable Membran um die Trägerstruktur mit den oben erwähnten günstigen Eigenschaften aufweisen. Besonders vorteilhaft sind hierbei Hydrogele aus extrazellulären Matrixkomponenten zu verwenden, vorzugsweise etwa ein Copolymer aus Chondroitinsulfat, z. B. Chondroitin-4-sulfat und Kollagen, z. B. Kollagen Typ II, und/oder Hyaluronsäure. Chondroitinsulfate und Hyaluronsäure sind die Hauptbestandteile der Binde- und Stützgewebesubstanz und auch im Knorpelgewebe, dort allerdings mit einem speziellen Protein verknüpft, vorhanden. Diese knorpeltypischen Matrixkomponenten können eine Redifferenzierung der Zellen beschleunigen und stellen geeignete Bausteine für die Neubildung der extrazellulären Matrix zur Verfügung. Es ist auch denkbar, derartige Komponenten synthetisch herzustellen. Weitere Fremdmaterialien für die Trägerstruktur sind z. B. Glykosaminoglykane bzw. Kollagen-GAG-Copolymere, in die die Zellen suspendiert sind. Neben dem erwähnten Chondroitinsulfat und dem Kollagen ist auch ein Keratansulfat denkbar. Statt der natürlichen Kollagene oder Proteoglykane können auch synthetische Polypeptide, z. B. Polylysine oder Polysaccharide verwendet werden. Hierbei ist es sogar denkbar, die Trägerstruktur fortzulassen, wenn es gelingt, nach dem Herstellen der Zellsuspension die extrazellulären Matrixkomponenten in geeigneter Weise zu vernetzen, z. B. durch Bestrahlung mit UV-Licht. An diese vernetzte Struktur können sich dann die Zellen anlagern.

Die Erfindung ist in Ausführungsbeispielen anhand der Zeichnung näher erläutert. In dieser stellen dar

Fig. 1 einen Ausschnitt aus einer Trägerstruktur mit daran angelagerten Zellen sowie Mikrokugeln, die in Molekülen einer extrazellulären Matrix suspendiert sind;

Fig. 2 eine schematische Schnittzeichnung der verwendeten Mikrokugeln.

Eine in Fig. 1 nur im Ausschnitt gezeigte dreidimensionale Trägerstruktur aus Polymerfasern 1 wird mit einer Suspension 2 getränkt, in der Zellen 3, in diesem Fall Knorpelzellen, und poröse Mikrokugeln 4, die etwa die gleiche Größe wie die Zellen haben, suspendiert sind. Die Suspension 2 besteht entweder aus Agarose und/oder einem der oben genannten Fremdmaterialien, d. h. z. B. extrazellulären Matrixkomponenten, die Bausteine für die Bildung der extrazellulären Matrix liefern.

Die nach der Implantation des Implantates resorbierbaren Mikrokugeln 4 weisen, wie schematisch in Fig. 2 dargestellt ist, kleine Hohlräume 5 auf, in die die Gewebeformung beeinflussende Faktoren, z. B. entzündungshemmende Faktoren wie Antibiotika etc. eingebunden sind. Bei der allmählichen Resorption der Mikrokugeln werden dann diese Faktoren verzögert freigegeben.

Die gesamte Trägerstruktur wird noch mit einer Hülle, z. B. der erwähnten Agarose ummantelt, wonach anschließend, wie im Hauptpatent beschrieben, die derart vorbereitete Trägerstruktur in eine Perfusionsapparatur eingesetzt und mit Nährlösung durchströmt wird. Anstatt die Trägerstruktur mit Agarose oder einem anderen Hydrogel zu ummanteln, ist es auch möglich, die Trägerstruktur mit Polyelektrolytkomplexen zu verkapseln, die ebenfalls bei geeigneter Zusammensetzung die Eigenschaften einer semipermeablen Membran aufweisen, d. h. für den hier gewünschten Zweck die Diffusion mit Nährlösung ermöglichen, jedoch das Ausschwemmen von extrazellulären Komponenten aus dem Inneren der Trägerstruktur verhindern. Ein solcher Polyelektrolytkomplex aus Polyanionen und Polykationen kann z. B. aus Protoglykanen und Polylysin aufgebaut werden. Dieser Polyelektrolytkomplex umschließt die vorbereitete Trägerstruktur praktisch vollständig mit einem semipermeablen Häutchen.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Herstellen eines Implantates aus Zellkulturen, insbesondere Knorpelzellen, wobei die Zellen auf eine resorbierbare dreidimensionale, im wesentlichen formstabile und entsprechend der gewünschten Form des Implantats vorgeformte Trägerstruktur mit einer zusammenhängenden inneren Oberfläche und einem geringen Volumen aufgebracht werden, in den inneren Hohlraum der Trägerstruktur die Zellen eingebracht werden, die die Zellen aufnehmende Trägerstruktur mit einem Material ummantelt wird, durch das die Nährlösung hindurchdiffundieren kann und die die Zellen aufnehmende Trägerstruktur mit einer Nährlösung zumindest solange perfundiert wird, bis sich zumindest teilweise eine die Zellen aneinanderbindende interzelluläre Matrix ausgebildet hat, dadurch gekennzeichnet, daß in die Trägerstruktur (1) resorbierbare Mikrokörper (4) eingebracht werden, in denen die Gewebeformung beeinflussende Faktoren aufgenommen sind, die ihrerseits bei der allmählichen Resorption der Mikrokörper freigegeben werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Mikrokörper poröse Mikrokugeln verwendet werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikrokörper einen Durchmesser aufweisen, der etwa

demjenigen der Zellen entspricht und etwa zwischen 10 und 200 Mikrometern, vorzugsweise zwischen 20 und 50 Mikrometern, liegt.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Material für die Mikrokörper resorbierbare Polymere, vorzugsweise Polylactide, verwendet werden.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als die Gewebeformung beeinflussende Faktoren entzündungshemmende Faktoren, insbesondere Antibiotika verwendet werden.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Antibiotika Cyclopeptid-Antibiotika, wie Cyclosporin A verwendet wird.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als die Gewebeformung beeinflussende Faktoren rekombinante gewebemorphogene Proteine verwendet werden.

8. Verfahren insbesondere nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in die Trägerstruktur (1) ein die Redifferenzierung von intensiv vermehrten Zellen beeinflussendes Fremdmaterial eingegeben wird, insbesondere ein Hydrogel aus extrazellulären Matrixkomponenten.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Fremdmaterial ein Copolymer aus Chondroitin-4-sulfat und Kollagen Typ II und/oder Hyaluronsäure verwendet wird.

10. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Fremdmaterial Kollagene, Proteoglykane, synthetische Polypeptide oder Polysaccharide verwendet werden.

11. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Fremdmaterial extrazellulären Matrixkomponenten analoge Materialien verwendet werden, die gegebenenfalls durch eine spezielle Behandlung, z. B. UV-Bestrahlung vernetzen.

12. Verfahren insbesondere nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerstruktur mit Polyelektrolytkomplexen ummantelt wird.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

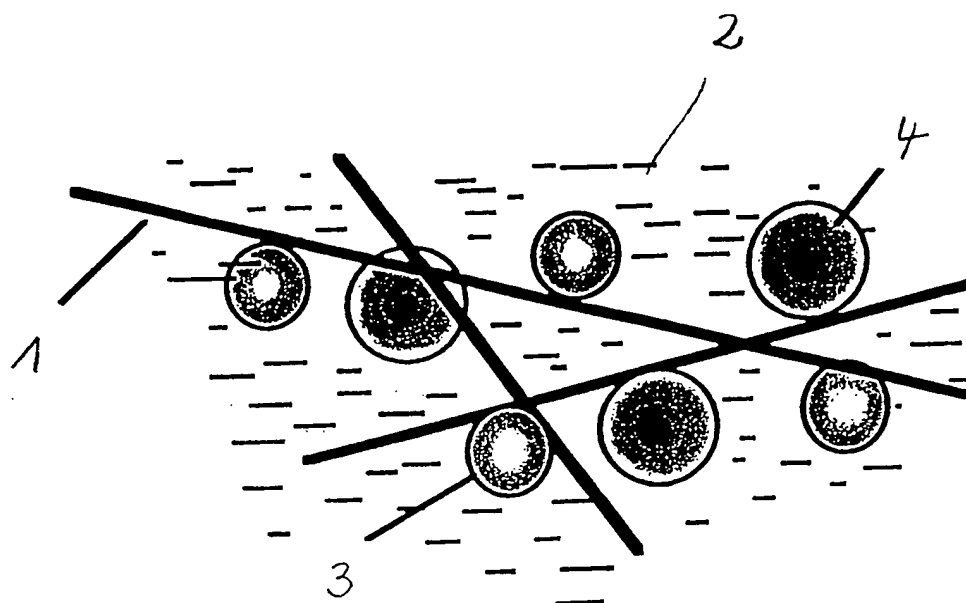
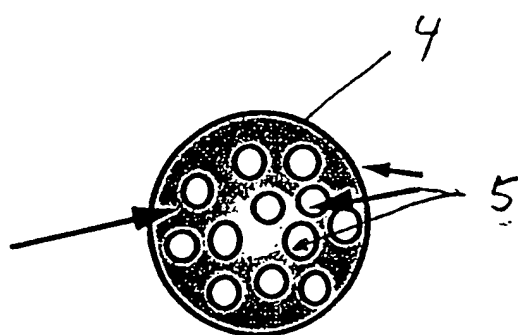


FIG. 1



z. B. 20 - 50
μm

FIG. 2

Translation

German Patent DE 44 31 598 A1

Published: March 7, 1996

Applicants: Michael Sittinger, Dr. Jesús Bujía

Addition to: DE 43 06 661.5

Title: Method of Preparing an Implant from Cell Cultures

ABSTRACT

In the proposed method for preparing an implant from cell structures, a threedimensional carrier structure to which the cells are added, is first coated and subsequently perfused with a nutrient solution, through which the cells are nourished. It is proposed by the invention to embed in the carrier structure resorbable microbodies, for example, porous microglobules (4), which release during the resorption factors that influence the tissue formation, for example, anti-inflammatory antibiotics. The formation of the intercellular matrix may also be improved in that the cells are introduced into the carrier structure with a suspension, which consists of extracellular matrix components or analogous materials.

SPECIFICATION

The invention relates to a method of preparing an implant from cell cultures, in particular cartilage cells, as is described in the main patent ... (Application No. P 43 06 661.5). In this method, the cells are applied to a carrier structure that is resorbable in the implanted state. Used as carrier structure is a threedimensional, substantially inherently stable carrier structure that is preformed in accordance with the desired shape of the implant and has a coherent inner surface and a small volume. The cells are introduced into an inner hollow space of this carrier structure. Subsequently, the carrier structure accommodating the cells is coated with a material which allows a nutrient solution to flow therethrough, preferably diffuse into the interior of the carrier structure. Thereafter, a nutrient solution perfuses, i.e. flows through the entire arrangement of the coated carrier structure with the cells received therein, until an intercellular matrix has formed that binds the cells together at least in part. Finally, the carrier structure is implanted and gradually resorbs in the body, while the cell matrix continues to develop at the same time.

The material for coating the carrier structure is selected such that the cell products necessary for building up the intercellular matrix, in particular collagens and proteoglycans, are retained in the interior of the carrier structure and not flooded out of the cell structure. A suitable material for this coating is, for example, agarose. Other materials may likewise be considered, provided they have the desired properties in the manner of a semipermeable membrane.

Used as carrier structure is preferably a threedimensional nonwoven of polymer fibers. Naturally, it is also possible to prepare the fibers for promoting adhesion of the cells.

Furthermore, it will be advantageous to introduce the cells into the carrier structure in a suspension with the

nutrient solution, the suspension containing in addition an extraneous material, for example, again agarose. This extraneous material increases on the one hand the viscosity of the suspension, but is also used on the other hand to redifferentiate the intensively multiplied cartilage cells, which have changed in their shape and are more similar to fibroblasts, back to cartilage cells. For such a "redifferentiation," the cells need a surrounding medium, such as the above-mentioned agarose.

In the described method, a distinction may be made between two phases of the implant development. Considered as a first phase may be preforming or conditioning the tissue in vitro. The second phase, however, comprises maturing and taking the tissue in vivo, i.e., after implantation. During the first phase, as described in the main patent, it is basically possible to control the tissue development, in that certain conditions and factors, such as for example the addition of serum or tissue-morphogenetic proteins, are prearranged, preferably via the perfusion system. After transplantation in vivo, there exists currently no longer a possibility of influencing the tissue development.

It is the object of the invention to improve the method disclosed in the main patent and to promote the tissue development by additional measures.

To this end, the invention proposes to embed in the carrier structure resorbable microbodies, which incorporate factors that influence the tissue development. These factors are again released during a gradual resorption of the microbodies. The use of microbodies may include, for example, porous microglobules having a diameter from about 10 to 200 micrometers, preferably from 20 to 50 micrometers, and consisting of a resorbable material, for example, polylactide, which binds the desired factors for differentiating tissue or for suppressing inflammation. Such factors may include, for example peptide factors, for example anti-inflammatory cyclopeptide antibiotics, such as glycosporin A, or suitable, recombinant tissue-

morphogenetic proteins, which are released in the transplant slowly, i.e., over a period of several months. When the microbodies, for example, aforesaid porous microglobules resemble in their size the cells, same may be admixed to the cell suspension during the initial preparation of the culture and, thus, be distributed in the polymer nonwoven in the same manner as the cells. During the preparation, it is necessary to adjust the degradation of the microbodies, so that the release of the factors extends over the desired time, for example, several months.

As described above, it will be advantageous to use in addition to the resorbable carrier structure, in particular a polymer nonwoven, also an extraneous material, for example agarose. In the place of agarose, it will also be possible to use other materials, which have a semipermeable membrane around the carrier structure with the aforesaid favorable properties. It is especially advantageous to use therefor hydrogels of extracellular materials, preferably, for example, a copolymer of chondroitin sulfate, for example, chondroitin-4-sulfate, and collagen, such as collagen type II, and/or hyaluronic acid. Chondroitin sulfates and hyaluronic acid are the main ingredients of connective and supporting tissue substances, and while they are also present in the cartilage tissue, they are linked therein to a special protein. These cartilage-typical matrix components are capable of accelerating redifferentiation of the cells, and provide suitable structural elements for the new formation of the extracellular matrix. It is also possible to prepare such components by synthesis. Other extraneous materials for the carrier structure include, for example, glycosaminoglycans or collagen GAG copolymers, in which the cells are suspended. Besides the foregoing chondroitin sulfate and collagen, it is also possible to use a keratan sulfate. In the place of natural collagens or proteoglycans, use may also be made of synthetic polypeptides, for example, polylysine, or polysaccharides. In this connection, the carrier structure may even be omitted,

should it be possible to crosslink, after preparing the cell suspension, the extracellular matrix components in suitable manner, for example by irradiation with ultraviolet light. It will then be possible to add the cells to this crosslinked structure.

The invention is described in more detail with reference to the drawing, in which:

Figure 1 is a cutout view of a carrier structure with cells added thereto as well as microglobules, which are suspended in molecules of an extracellular matrix; and

Figure 2 is a schematic sectional view of the microglobules used.

As shown in the cutout view of Figure 1, a three-dimensional carrier structure 1 is impregnated with a suspension 2, which contains suspended therein cells 3, in this instance cartilage cells, and porous microglobules 4 which have approximately the same size as the cells. The suspension 2 consists of either agarose and/or one of the aforesaid extraneous materials, i.e., for example, extracellular matrix components, which supply structural elements for the formation of the extracellular matrix.

As schematically shown in Figure 2, the microglobules 4 that are resorbable after implantation of the implant, exhibit small hollow spaces 5, which contain factors that influence the tissue growth, for example anti-inflammatory factors, such as antibiotics, etc. During a gradual resorption of the microglobules, these factors will be released with a delay.

The entire carrier structure is surrounded with a coat of, for example, the aforesaid agarose. Thereafter, as described in the main patent, the thus-prepared carrier structure is placed in a perfusion apparatus and diffused with a nutrient solution. Instead of coating the carrier structure with agarose or another hydrogel, it is also possible to encapsulate the carrier structure with polyelectrolyte complexes which exhibit likewise in a suitable composition the properties of a semipermeable

membrane, i.e., while they permit diffusion with a nutrient solution as desired for the present purpose, the prevent flooding of extracellular components from the interior of the carrier structure. Such a polyelectrolyte complex of polyanions and polycations may be structured, for example, from proteoglycans and polylysine. This polyelectrolyte complex encloses the prepared carrier structure practically totally with a semipermeable membrane.

C L A I M S

1. Method of preparing an implant from cell cultures, in particular cartilage cells, the method comprising the steps of
 applying the cells to a resorbable, threedimensional carrier structure that is substantially inherently stable and preformed to the desired shape of the implant and has a coherent inner surface and a small volume;

bringing the cells into an interior hollow space of the carrier structure;

coating the carrier structure that accommodates the cells with a material which permits diffusion of a nutrient solution;

and perfusing the carrier structure accommodating the cells with the nutrient solution until an intercellular matrix forms at least in part, which binds the cells together,

characterized by the step of

introducing into the carrier structure (1) resorbable microbodies (4), which contain factors influencing the tissue development, which factors are again released during a gradual resorption of the microbodies.

2. Method as in claim 1, characterized by the step of using as microbodies porous microglobules.

3. Method as in claim 1 or 2, characterized in that the microbodies have a diameter which corresponds approximately

to that of the cells, and ranges from about 10 to 200 micrometers, preferably 20 to 50 micrometers.

4. Method as in one of the foregoing claims, characterized by the step of using as material for the microbodies resorbable polymers, preferably polylactides.

5. Method as in one of the foregoing claims, characterized by the step of using as factors for influencing the development of tissue anti-inflammatory factors, in particular antibiotics.

6. Method as in claim 5, characterized by step of using as antibiotics cyclopeptide antibiotics, such as cyclosporin A.

7. Method as in one of the foregoing claims, characterized by the step of using as factors for influencing the development of tissue recombinant, tissue-morphogenetic proteins.

8. Method, in particular according to one of the foregoing claims, characterized by the step of adding to the carrier structure (1) an extraneous material for influencing a redifferentiation of intensively multiplied cells, in particular a hydrogel of extracellular matrix components.

9. Method as in claim 8, characterized by the step of using as extraneous material a copolymer of chondroitin-4-sulfate and collagen type II and/or hyaluronic acid.

10. Method as in claim 7, characterized by the step of using as extraneous material collagens, proteoglycans, synthetic polypeptides, or polysaccharides.

11. Method as in claim 7, characterized by the step of using as extraneous material materials analogous to extracellular matrix components, which crosslink, if need be, by a special treatment, for example ultraviolet irradiation.

12. Method, in particular according to one of the foregoing claims, characterized by the step of coating the carrier structure with polyelectrolyte complexes.

One sheet of drawings attached.